ChinaXiv合作期刊

箭叶淫羊藿种子的休眠类型与萌发研究

吉浴芳[1,2], 宋松泉[3], 田向荣[1], 高家东[2], 戴嘉兴[2], 刘军[2*]

（1. 吉首大学 生物资源与环境科学学院，湖南 吉首 416000；2. 广东省农作物种质资源保存与利用重点实验室/广东省农业科学院 基因研究中心，广州 510640；
3. 中国科学院植物研究所，北京 100093)

摘 要：箭叶淫羊藿具有重要的药用价值和很大的市场需求，但其种子的休眠和萌发特性仍然不够清楚，严重地影响其产业化育苗与栽培。为探明其种子的休眠类型及其打破休眠的最适方法，该文以箭叶淫羊藿的成熟种子为材料，研究了种子对水分的吸收，种子的脱水耐性，以及温度、层积和植物激素对种子休眠与萌发的影响。结果表明：箭叶淫羊藿种子（1）不具有物理休眠；（2）具有耐脱水性；（3）在 4~25 ºC 和黑暗条件下，种子的萌发率为零，具有休眠特性；（4）胚/种子的比值非常小，4 ºC、10 ºC 和变温层积能显著地促进胚的生长发育以及增加种子的萌发速率和萌发率；（5）赤霉素和氟啶酮显著增加种子的萌发速率和萌发率。综上认为，箭叶淫羊藿种子的休眠类型为形态生理休眠，释放休眠和促进萌发的最适方法是将种子在 10 ºC 中层积 30 d，然后在 4 ºC 中萌发。

关键词：脱水耐性, 箭叶淫羊藿种子, 萌发, 形态生理休眠, 层积

中图分类号：Q945　　　**文献标识码：**　　　**文章编号：**

Dormancy type and germination of *Epimedium sagittatum* seeds

JI Yufang[1,2], SONG Songquan[3], TIAN Xiangrong[1], GAO Jiadong[2], DAI Jiaxing[2], LIU Jun[2*]

(1. *College of Biology and Environmental Sciences*, *Jishou University*, Jishou 416000, Hunan, China ; 2. *Guangdong Provincial Key Lab for Crop Germplasm Resources Preservation and Utilization*/*Agro-Biological Gene Research Center*, *Guangdong Academy of Agricultural Sciences*, Guangzhou 510640, China; 3. *Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100093, China)

Abstratct: *Epimedium sagittatum* plants have an important medicinal value and a huge market demand, but the characteristics on dormancy and germination of their seeds are still unclear, which seriously affect its industrial seedling production and cultivation. In order to verify the type of seed dormancy and the optimal way to break dormancy, the mature seeds of *E. sagittatum* were used as experimental materials, we investigated the water uptake and the desiccation tolerance of seeds, as well as the effects of temperature, stratification and phytohormone on seed dormancy and germination. The results were as follows: (1) *E. sagittatum* seeds had no physical dormancy and (2) Have desiccation tolerance. (3) The germination percentage of seeds was zero at 4-25 ºC and darkness, and these seeds had dormancy characteristics. (4) The embryo/seed ratio was very small, as well as embryo growth and development and seed germination rate and germination percentage were increased by stratification at 4 ºC, 10 ºC and fluctuating temperature.

基金项目：国家自然科学基金项目 (31871716)；广东省农作物种质资源保存与利用重点实验室项目 (2020B121201008) [Supported by National Natural Science Foundation of China (31871716); Guangdong Provincial Key Laboratory Project of Crop Germplasm Resources Conservation and Utilization (2020b121201008)]。

第一作者：吉浴芳 (1997-)，硕士研究生，主要从事种子生物学研究，(E-mail) 710211436@qq.com。

***通信作者：**刘军，博士，研究员，主要从事种子生物学研究，(E-mail) liujun@gdaas.cn

chinaXiv:202208.00181v1

(5) Gibberellin and fluridone significantly increased the germination rate and germination percentage of seeds. We considered that the dormancy type of *E. sagittatum* seeds was morphophysiological dormancy. The optimal method to release dormancy and promote germination was that seeds were stratified at 10 ºC for 30 days and then germinated at 4 ºC.

Key words: dehydration tolerance, *Epimedium sagittatum* seed, germination, morphophysiological dormancy, stratification

种子休眠是活种子在适宜的环境条件下暂时不能萌发的一种机制，对种子植物的生存和繁衍起关键作用 (Gao ＆ Ayele, 2014)。研究提出，种子休眠是植物对环境适应性的一个重要组成部分 (Donohue et al., 2010; Huang et al., 2010)。高水平的种子休眠会延迟萌发和萌发不整齐，从而导致生长季节的长度缩短和生长不一致；相反，低水平的休眠可能引起在有利的生长季节开始之前萌发，存在幼苗死亡的风险 (Donohue et al., 2010)，从而降低作物的产量和质量。

休眠是一个复杂的性状，主要由遗传和环境因素决定；植物物种之间存在着种子休眠的多样性和普遍性(Baskin & Baskin, 2014)。种子休眠可分为生理休眠 (physiological dormancy, PD)、形态休眠 (morphological dormancy, MD)、形态生理休眠 (morphophysiological dormancy, MPD)、物理休眠 (physical dormancy) 和组合休眠 (combinational dormancy) (Baskin & Baskin, 2004，2014; Iwasaki et al., 2022)。PD存在于具有充分发育和成熟胚的种子中，主要是由于种子组分中抑制剂的存在和/或者植物生长物质的缺乏所引起的 (Chen et al., 2010)。PD是最普遍的休眠形式，可分为深度、中度和浅生理休眠，广泛存在于裸子植物和所有主要被子植物中 (Baskin & Baskin, 2004, 2014; Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006)。具有MD 的种子，胚小 (未发育完全)、但已分化；种子的萌发不需要释放休眠的预处理，但需要较长的时间让胚生长至足够的体积，然后萌发。MPD 的种子具有未发育完全和生理休眠的胚，其种子萌发需要释放休眠的预处理。在具有MPD的种子中，胚的生长/胚根突破种皮需要的时间比MD 种子长得多。

植物激素脱落酸 (abscisic acid, ABA) 和赤霉素 (gibberellin, GA) 参与种子休眠和萌发的控制 (Weitbrecht et al., 2011; Iwasaki et al., 2022)。Dong等 (2012) 发现，氟啶酮 (fluridon, ABA生物合成的抑制剂) 和GA_3显著降低莴苣种子萌发的热休眠，而烯唑醇 (diniconazole, ABA分解代谢酶ABA 8'-羟化酶的抑制剂) 和多效唑 (paclobutrazol, GA生物合成途径的抑制剂) 增加莴苣种子萌发的热休眠。在降低莴苣种子萌发的热休眠中，多效唑明显地拮抗氟啶酮的作用，而氟啶酮显著地增加GA_3的作用。特别是ABA和GA水平之间的平衡及其各自的信号通路在诱导和维持休眠以及促进萌发的调控中起重要作用 (Finkelstein et al., 2008; Graeber et al., 2012; 宋松泉等, 2020a, b)。此外，种子休眠也被一些环境因素释放，例如，后熟、变温、冷/暖层积、交替光照等，具体取决于物种 (Baskin & Baskin, 2004, 2014; Black et al., 2006；Finch-Savage ＆ Leubner-Metzger, 2006)。

淫羊藿属 (*Epimedium* L.) 植物为小檗科 (Berberidaceae) 多年生草本植物，该属植物约55 种，我国为45 种，其中淫羊藿 (*Epimedium brevicornum*)、箭叶淫羊藿 (*Epimedium sagittatum*)、柔毛淫羊藿 (*Epimedium pubescens*)、朝鲜淫羊藿 (*Epimedium koreanum*) 和巫山淫羊藿 (*Epimedium wushanense*) 为《中华人民共和国药典》所收载 (国家药典委员会，2020) 。淫羊藿为常用中药，最早记载于《神农本草经》，具有补肾壮阳、祛风除湿之功效；在临床上，淫羊藿还常用于治疗骨质疏松、更年期综合症、乳房肿块、高血压、冠心病等；另外淫羊藿还具有增强免疫力、抗衰老、抗肿瘤、抗艾滋病等作用。研究表明，淫羊藿含有多种生理活性很强的成分，主要包括黄酮类化合物、生物碱、多糖、木脂素和一些必需的微量元素 (Kang et al., 2012; 李聪聪等, 2020)。长期以来，由于种子萌发困难，淫羊藿的栽培大多采用挖取野生植株进行分蔸种植；但其繁殖系数低，并对野生资源造成了严重的破坏。近年来，随着市场需求的大量增加，淫羊藿野生资源的蕴藏量逐年锐减，濒临枯竭。因此，利用种子进行种苗繁育就成为淫羊藿产业化栽培中必须解决的关键问题。

chinaXiv:202208.00181v1

ChinaXiv合作期刊

研究表明，淫羊藿属植物的果实成熟时，种胚发育不完全，需要经过一段时间的冷层积或者冷暖层积才能萌发，具有明显的休眠现象 (樊家乙等, 2010; 付长珍等, 2012; 田向荣等, 2015; 苏贺等, 2016; Rhie ＆ Lee, 2020)。GA3 处理促进巫山淫羊藿 (苏贺等, 2016) 和朝鲜淫羊藿 (Rhie ＆ Lee, 2020) 种胚的生长，氟啶酮处理显著增加巫山淫羊藿种子的萌发率 (苏贺等, 2016)。田向荣等 (2015) 利用常规萌发试验以及直接测量和石蜡制片技术初步研究了箭叶淫羊藿种子的萌发特性。至今为止，箭叶淫羊藿种子的休眠和萌发特性仍然不够清楚。本文以成熟的箭叶淫羊藿种子为材料，研究了种子对水分的吸收，种子的脱水耐性，以及温度、层积和植物激素对种子萌发的影响；试图为探明箭叶淫羊藿种子的休眠类型及其释放休眠和促进萌发的适宜方法，为产业化育苗提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

成熟的箭叶淫羊藿 (*Epimedium sagittatum*) 果实于 2020 年 6 月采集于张家界八大公山 (29°77′ N，110°07′ E，海拔 1 302 m)。采集地年平均温度小于 9.9 °C，最冷月为 1 月，平均温度 3.5~4.3 °C，最热月为 7 月，平均温度 26.3~28 °C；年均降雨量 2 300 mm，春夏季 (4–6 月) 降雨最多，约占 48%。果实收集后，置于（25±3）°C 和（50±5）%相对湿度下自然干燥，待种子从果荚中脱落后，干燥到种子含水量为（9.7±0.49）%；其中，一部分种子用于耐脱水性分析，另一部分种子在 4 °C 中贮藏备用。

玉米郑单 958 (*Zea ways* L. ‘Zhengdan 958’) 和水稻日本晴 (*Oryza sativa* L. 'japonica') 种子由广东省农业科学院农业生物基因中心种质资源实验室提供。

1.2 耐脱水性分析

将含水量为 9.7%的种子置于筛网中，然后将筛网置于盛有干燥硅胶的干燥器中，分别脱水 0、2、4、8、12、24、36 h 后，一部分种子用于测定含水量，另一部分种子在 4 °C 下层积 60 d 后在 10°C 和黑暗条件下萌发。

1.3 含水量测定

种子含水量的测定参照国际种子检验协会的方法 (International Seed Testing Association, 1999)，以鲜重的百分比表示。

1.4 种子对水分的吸收

箭叶淫羊藿种子、玉米种子和水稻种子分别播种在垫有两层滤纸的培养皿中，加入 7 mL 蒸馏水，于 25 °C 和黑暗中分别吸胀不同时间后测定种子的含水量，种子的含水量用鲜重百分比来表示。

1.5 层积处理

层积基质为珍珠岩。先将珍珠岩在自来水中除去粉尘，121 °C 中灭菌 30 min，冷却后装入自封袋中并加入适量的无菌水，室温下放置 20 min 后，用吸管将多余的水去掉。将含水量为 9.7%的箭叶淫羊藿种子与湿润的珍珠岩 (V/V = 1:10) 在自封袋中充分混合，然后分别在 4°C、10°C、（4+10）°C、（10+4）°C、（4+10+4）°C 和黑暗条件下层积。层积不同的时间组合后，取样。一部分种子利用 OLYMPUS (SZ61) 体式显微镜观察胚的形态变化，拍照、计算胚/种子的比例 (胚的长度/种子的长度)；另一部分种子做萌发试验，测定种子的萌发速率和萌发率。

1.6 种子萌发

chinaXiv:202208.00181v1

chinaXiv:202208.00181v1

经不同处理的种子用 0.1% (V/V) NaClO 灭菌 15 min 后，播种于垫有两层滤纸的培养皿中，加入 6 mL 蒸馏水或者不同浓度的植物激素 GA_3 或者氟啶酮，然后在注明温度和黑暗的条件下萌发。以胚根突破种皮 2 mm 作为萌发的标准。

1.7 统计分析

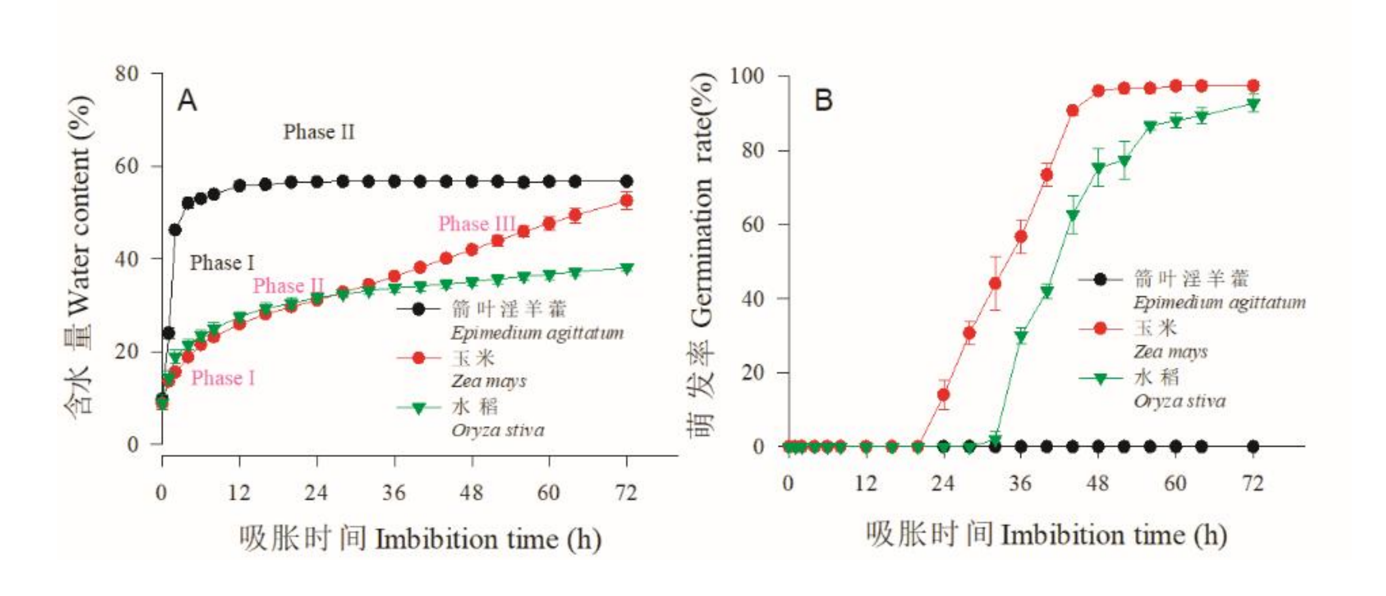
所有数据均使用 SPSS 20.0 软件的单因素方差分析模型 (one-way ANOVA model) 进行分析，平均数差异的显著性利用 Student-Newman-Keuls 检验确定 (S-N-K, P=0.05)。

2 结果

2.1 种子对水分的吸收

为了解种子是否具有物理休眠，将新鲜收获的箭叶淫羊藿、玉米和水稻种子在 25 °C 和黑暗中分别吸胀 0–72 h。我们观察到，箭叶淫羊藿种子具有两阶段的水分吸收，即阶段 I (0–4 h) 的快速吸水和阶段 II 的缓慢吸水直到平台期 (4–72 h) (图 1：A)。在阶段 I，种子的含水量从 9.7%增加到 52%；在阶段 II，种子的含水量从 52%增加到 56.7%。玉米和水稻种子的吸水过程可分为 3 个阶段，即阶段 I 的快速吸水，阶段 II 的缓慢吸水，以及阶段III种子萌发后的迅速吸水 (图 1：A)。

在吸胀的 72 h 内，未观察到箭叶淫羊藿种子萌发；相反，玉米和水稻种子随着吸水逐渐萌发 (图 1：B)。玉米和水稻种子达到 10%萌发率的时间分别为 22 h 和 33 h，达到 50%萌发率的时间分别为 34 h 和 42 h；当吸胀 72 h 时，玉米和水稻种子的萌发率分别达到 97%和 93% (图 1：B)。



干种子在 25 °C 和黑暗中吸胀表明的时间后，种子的含水量和萌发率被测定。胚根伸出种皮 2 mm 作为种子完成萌发的标准。所有的数值均为 100 粒种子重复 3 次的平均值±标准误。

The water content and germination of seeds were determined after dry seeds were imbibed at 25 °C and darkness for an indicated time. A radicle length of 2 mm was used as the criterion for completion of germination. All values were the mean ± SE of three replicates for 100 seeds each.

图 1 箭叶淫羊藿（*Epimedium agittatum*）、玉米（*Zea mays*）和水稻（*Oryza stiva*）种子的水分吸收 (**A**) 与萌发 (**B**)

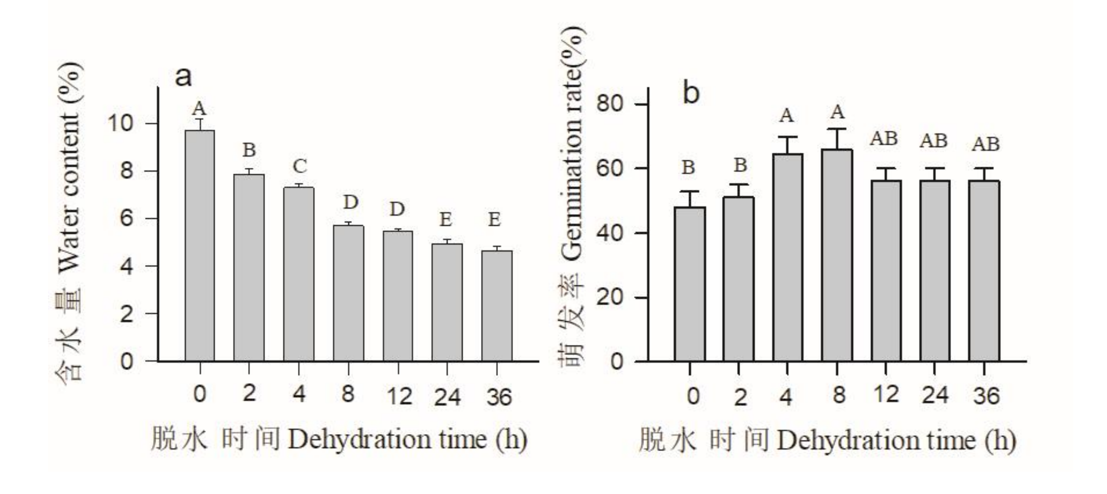
Fig. 1 Water uptake (**A**) and germination (**B**) of *Epimedium sagittatum*, *Zea mays* and *Oryza stiva* seeds

2.2 脱水对种子萌发的影响

chinaXiv:202208.00181v1

为研究箭叶淫羊藿种子的耐脱水性，将含水量为 9.7% (鲜重为基础) 的箭叶淫羊藿种子置于干燥硅胶表面进一步脱水不同的时间。脱水初期，种子的含水量下降较快，然后缓慢下降。例如，脱水 2 h 时，种子的含水量下降了 18.9%；从脱水 8 h 至 12 h，含水量仅下降了 4.2% (图 2：A)。

脱水 4 h 和 8 h，当含水量从 9.7%下降到 7.3%和 5.7%时，种子 (经 4 °C 层积 60 d 后) 的萌发率增加；随着进一步脱水，种子的萌发率稍微下降，但仍高于对照，与对照没有显著性差异 (图 2：B)。脱水后，种子的萌发速率加快，例如未经脱水的种子在萌发的第 155 d 开始萌发，而经过脱水的种子在萌发的 105 d 开始萌发 (未表明数据)。



a. 含水量的变化；**b**. 萌发率的变化。种子在干燥硅胶表面被分别脱水不同的时间后，测定种子的含水量和萌发率。脱水后的种子先在4 °C下层积60 d，然后在10°C和黑暗条件下萌发72 d；胚根伸出种皮2 mm作为种子完成萌发的标准。所有的数据为50粒种子四次重复的平均值 ± 标准误。条形图上相同的大写字母表示不同处理之间没有显著性差异 (S-N-K, *P*=0.05)。

a. Change of water content; **b**. Change of germination. Water content and germination of seed were determined after seeds were dehydrated at surface of dry silica gel for different times. Dehydrated seeds were first stratified at 4°C for 60 d, and then germinated at 10°C and darkness for 72 d. A radicle length of 2 mm was used as the criterion for completion of germination. All values are means ± SE of four replicates of 50 seeds each. The same uppercase letters above bars represent no significant difference among different treatments (S-N-K, *P*=0.05).

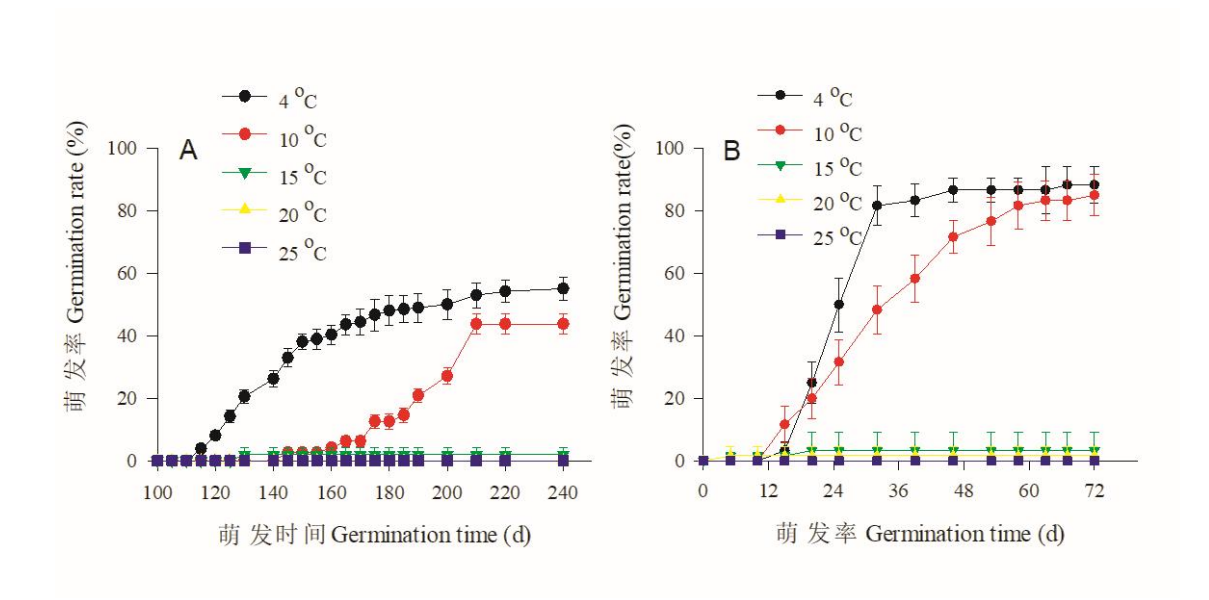
图2 箭叶淫羊藿种子对脱水的反应

Fig. 2 Response of *Epimedium sagittatum* seeds to dehydration.

2.3 温度对种子萌发的影响

为发现箭叶淫羊藿种子的适宜萌发温度，新鲜采集的干燥种子分别在 4、10、15、20、25°C 和黑暗条件下吸胀 30 d，其萌发率为零 (未表明数据)。然而，在 4°C 和 10°C 的条件下，种子分别在吸胀的 115 d 和 145 d 开始萌发，随着吸胀时间的进一步延长，种子的萌发率增加；到吸胀 240 d 时，种子的萌发率分别为 55%和 44% (图 3：A)。而在 15、20、25°C 的条件下，到吸胀的 240 d，种子的萌发率分别为 2%、0 和 0。种子在 4°C 和 10°C 的条件下能够部分萌发，在 4 °C 中的萌发速率和萌发率明显高于 10 °C (图 3：A)。

为了进一步找到种子的适宜萌发温度，将在 10 °C 层积 60 d 后再转移到 4 °C 中层积 30 d 的种子置于不同温度和黑暗条件下萌发。结果表明，在 4、10、15、20、25°C 下，种子的萌发率分别为 88%、85%、3%、2%和 0，适宜的萌发温度为 4 °C 和 10 °C。在萌发初期，种子在 10 °C 中的萌发速率稍微早于 4 °C，但随着萌发时间的增加，在 4 °C 下的萌发速率和萌发率都高于 10 °C (图 3：B)。



A. 新鲜采集的干燥种子；**B**. 10 °C 层积 60 d 后再转移到 4°C 层积 30 d 的种子。种子分别在不同的温度和黑暗下萌发表明的时间。胚根伸出种皮 2 mm 作为种子完成萌发的标准。所有的数据为 50 粒种子四次重复的平均值±标准误。

A. Freshly-collected dry seeds; **B**. Seeds stratified at 10 °C for 60 d plus at 4 °C for 30 d. Seeds were germinated at different temperatures and darkness for an indicated time, respectively. A radicle length of 2 mm was used as the criterion for completion of germination. All values are means ± SE of four replicates of 50 seeds each.

图 3 温度对箭叶淫羊藿种子萌发的影响

Fig. 3 Effects of temperature on germination of *Epimedium sagittatum* seeds

2.4 层积处理对胚生长和种子萌发的影响

层积对胚生长的促进作用。箭叶淫羊藿种子从果荚脱落时，种子中胚的体积较小，呈球形胚，胚比种子 (embryo/seed, E/S) 的比值仅为 0.07 (图 4：A 和 4：B)。 随着在 4 ºC 和 10 ºC 中层积时间的增加，胚逐渐从球形胚发育到心形胚、鱼雷形胚和成熟胚，胚的体积也不断增加 (图 4)。

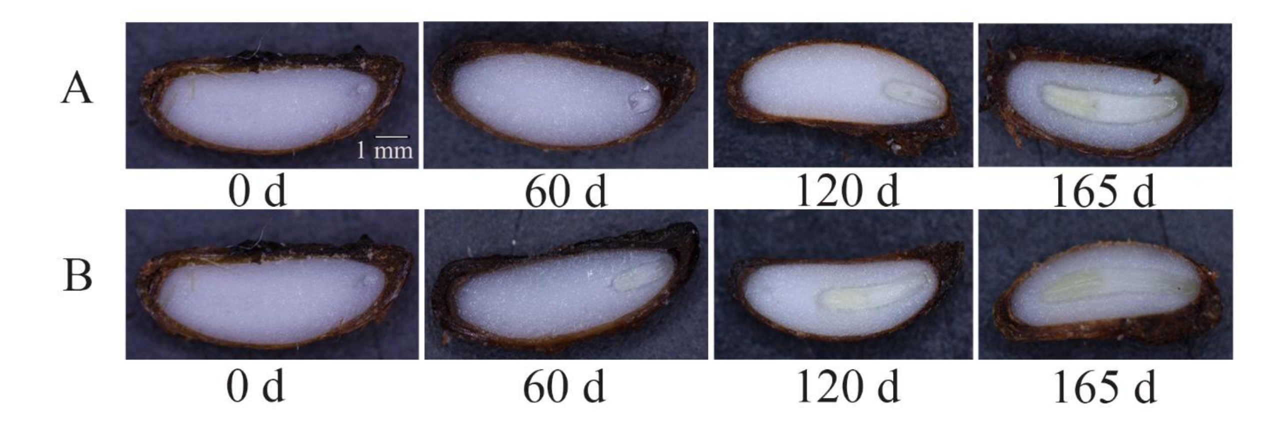
当种子在 4 ºC 中层积时，胚在层积的 0~60 d 生长缓慢 (E/S 值较小)，到层积 60 d 时，E/S 比值为 0.09；在层积的 61~90 d 胚逐渐生长，到层积 90 d 时 E/S 比值为 0.14；90 d 后胚迅速生长，到层积 165 d 时 E/S 比值为 0.88 (图 4：C)。

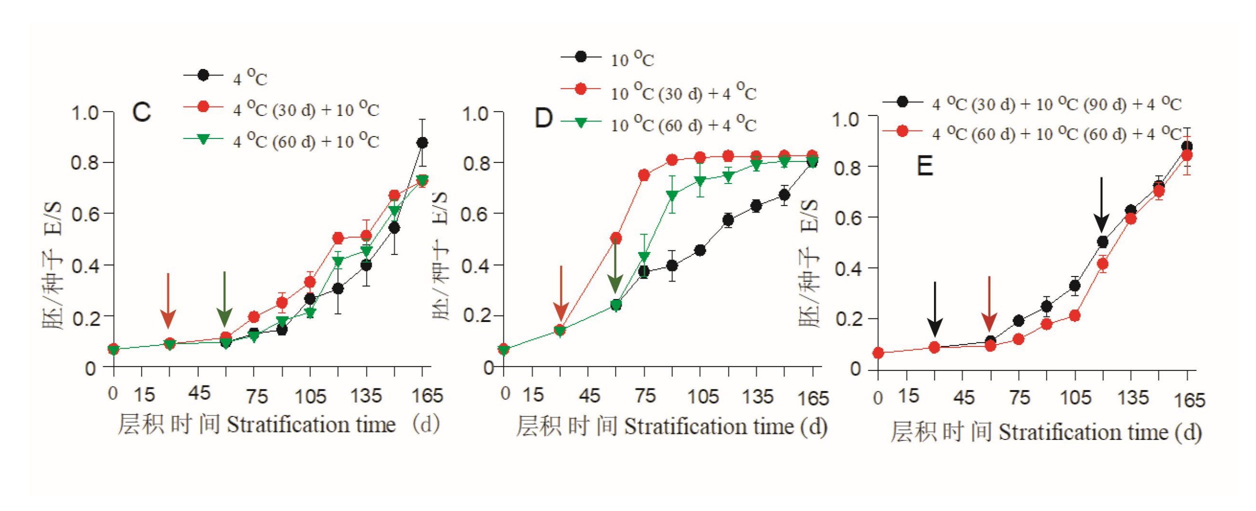
当种子在 10 °C 中层积时，胚的生长逐渐增大；到层积 165 d 时，其 E/S 比值为 0.8 (图 4：D)。我们观察到，在 10 °C 中层积的种子，其 E/S 比值显著大于在 4 °C 中层积的种子。例如在 10 °C 中层积 60 d 的种子的 E/S 比值 (0.24) 比在 4 °C 中层积相同时间 (0.09) 时增加了 167% (图 4：D)。

当种子在 4 °C 中层积 30 d 后转移到 10 °C 中层积时，胚的生长速率比一直在 4 °C 中层积生长更快。例如从 4 °C 中层积 30 d 后转到 10 °C 中继续层积 60 d 的种子，其 E/S 比值 (0.25) 比仅仅在 4 °C 中层积 90 d 的种子 (0.144) 增加了约 74%；在 4 °C 中层积 60 d 后转移到 10 °C 中层积的种子其 E/S 比值在层积初期与一直在 4 °C 中层积的种子类似，随着在 10 °C 中层积时间的延长，其 E/S 比值有所增加 (图 4：C)。种子在 10 °C 中层积 30 d 或者 60 d 后再转移到 4 °C 中层积时，其 E/S 比值均显著大于一直在 10 °C 中层积种子的 E/S 比值；例如种子一直在 10 °C 中层积 90 d 时，其 E/S 比值为 0.4；在 10 °C 中层积 30 d 后转移到 4 °C 中层积 60 d，其 E/S 比值为 0.83；在 10 °C 中层积 60 d 后转移到 4 °C 中层积 30 d，其 E/S 比值为 0.67 (图 4：D)。

chinaXiv:202208.00181v1

chinaXiv:202208.00181v1





新鲜采集的干燥种子用不同的温度组合层积表明的时间后，用体式显微镜观察和测定胚的大小，拍照和计算 E/S 的比值。**A**，**B**. 在 4 °C 和 10 °C 层积过程中胚的形态变化；**C-E**. 在不同温度组合层积过程中 E/S 比值的变化。图中箭头表示温度变化的时间点。所有的数据为 10 粒种子三次重复的平均值±标准误。

The freshly-collected dry seeds were stratified in different temperature combinations for an indicated time, and the embryo size was then observed, measured, and photographed by stereomicroscope, and the E/S ratio was calculated. **A**，**B**. Morphological change of embryo during stratification at 4 °C and 10 °C, respectively; **C-E**. Change of E/S ratio during stratification at different temperature combinations. The arrow in the figure indicates the time point of temperature change. All values are means ± SE of three replicates of 10 seeds each.

图 4 不同层积处理对箭叶淫羊藿胚生长 (胚/种子，E/S) 的影响

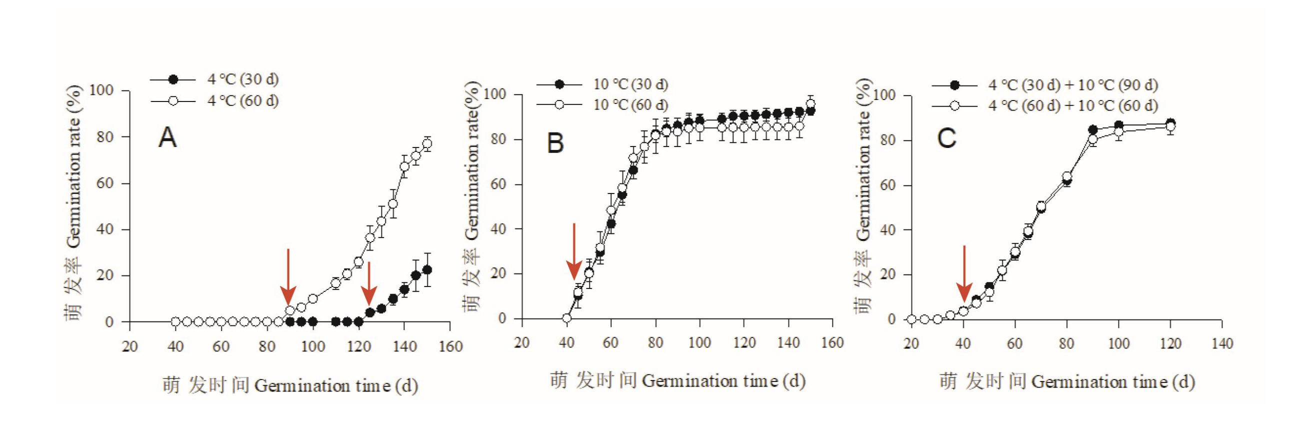
Fig. 4 Effect of different stratification treatments on embryo growth (embryo/seed, E/S) of *Epimedium sagittatum* seeds

种子在 4 °C 层积 30 d 和 10 °C 层积 90 d 后再转移到 4 °C 中层积，或者在 4 °C 层积 60 d 和 10 °C 层积 60 d 后再转移到 4 °C 中层积，胚的生长 (E/S) 都表现出相同的趋势；但在层积的 75 d~135 d，前者的生长比后者稍微快些，从 136 d~165 d，二者的生长没有明显差异；到层积 165 d 时，二者的 E/S 比值均大于 0.8 (图 4：E)。

层积对种子萌发的促进作用。种子在 4 °C 中分别层积 30 d 或者 60 d 后，置于 10 °C 和黑暗中萌发，随着层积时间的延长种子的萌发速率和萌发率显著增加 (图 5：A)。种子在 10 °C 中层积 30 d 或者 60 d 后，置于 4 °C 和黑暗中萌发，种子的萌发速率和萌发率也显著增加，在 10 °C 中层积 30 d 和 60 d 的作用效果类似 (图 5：B)。

chinaXiv:202208.00181v1

我们注意到，种子在 10°C 中层积 30 d 或者 60 d 后在 4°C 中的萌发速率和萌发率远比在 4 °C 中层积 30 d 或者 60 d 后在 10 °C 中萌发的种子高得多 (图 5：A 和 B)。例如 4°C 中层积 30 d 和 60 d 的种子在 10 °C 中的最初萌发时间分别为 125 d 和 90 d，在萌发 150 d 时的萌发率分别为 22.5%和 67%；在 10 °C 中层积 30 d 和 60 d 的种子在 4 °C 中的最初萌发时间均为 45 d，在萌发 150 d 时的萌发率分别为 93%和 96 %。在 4 °C 中层积 60 d 的种子在 10 °C 中萌发率达到 50%的时间为 135 d，而在 10 °C 中层积 30 d 的种子在 4 °C 中萌发率达到 50%的时间仅为 60 d (图 5：A 和 B)。



A. 种子在 4 °C 中分别层积 30 d 和 60 d，然后在 10 °C 和黑暗条件下萌发；**B**. 种子在 10 °C 中分别层积 30 d 和 60 d，然后在 4 °C 和黑暗条件下萌发；**C**. 种子在 4 °C 中层积 30 d 后转移到 10 °C 中继续层积 90 d，或者在 4 °C 中层积 60 d 后转移到 10 °C 中继续层积 60 d，然后在 4 °C 和黑暗条件下萌发。图中箭头表示种子开始萌发的时间点。胚根伸出种皮 2 mm 作为种子完成萌发的标准。所有的数据为 50 粒种子四次重复的平均值±标准误。

A. Seeds were stratified at 4 ºC for 30 and 60 d, respectively, and then germinated at 10 ºC and darkness; **B**. Seeds were stratified at 10 ºC for 30 and 60 d, respectively, and then germinated at 4 ºC and darkness; **C**. Seeds were stratified at 4 ºC for 30 d and at 10 ºC for 90 d or at 4 ºC for 60 d and at 10ºC for 60 d, and then germinated at 4 ºC and darkness. The arrow in the figure indicates the time point at which the seed begins to germinate. A radicle length of 2 mm was used as the criterion for completion of germination. All values are means ± SE of four replicates of 50 seeds each.

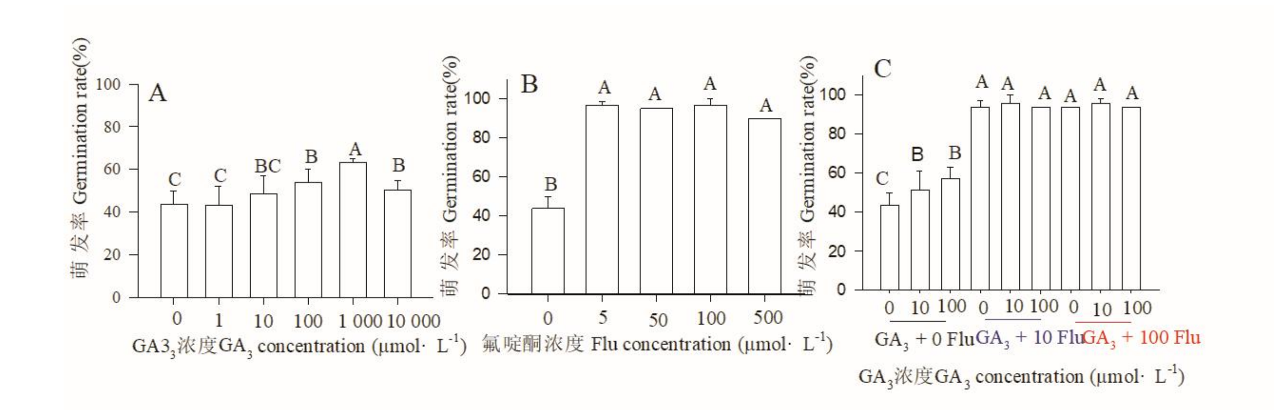
图 5 不同层积处理对箭叶淫羊藿种子萌发的影响

Fig. 5 Effect of different stratification treatments on germination of *Epimedium sagittatum* seeds

两种变温层积 (4 °C层积30 d + 10 °C层积90 d或者4 °C层积60 d + 10 °C层积60 d) 都能显著地增加种子在4 °C中的萌发速率和萌发率，萌发率达到50%的时间均为70 d (图5：C)；与在10 °C中层积30 d 或者60 d然后在4 °C中萌发的种子比较，种子的萌发速率和萌发率稍微降低，但比在4 °C中层积30 d或者60 d然后在10 °C中萌发的种子高得多 (图5)。

2.5 赤霉素和氟啶酮对种子萌发的促进作用

为了解箭叶淫羊藿种子萌发对植物激素 GA_3 和氟啶酮的响应，种子先在 10°C 和黑暗中层积 120 d，使胚发育成熟，然后在不同浓度的 GA_3、氟啶酮和 GA_3 + 氟啶酮中萌发。结果表明，1、10 μmolL^{-1} GA_3 对种子的萌发没有作用，100~10 mmol • L^{-1} GA_3 明显地促进种子萌发，10 mmol • L^{-1} GA_3 的促进作用明显地低于 1 mmol • L^{-1} GA_3，以及种子的萌发率仍然低于 70% (图 6：A)。5~500 μmol • L^{-1} 氟啶酮显著地促进种子萌发，其萌发率都高于 90%，均比对照增加 46%以上 (图 6：B)。在添加 10 和 100 μmol • L^{-1} GA_3 的同时再分别添加 10 或者 100 μmol • L^{-1} 的氟啶酮，种子的萌发速率 (未表明数据) 和萌发率都比单独添加相同浓度的 GA_3 高得多，萌发率约为 95% (图 6：C)。



种子在 10 °C 和黑暗中层积 120 d，然后在不同浓度的 GA_3 (**A**)、Flu (**B**) 和 GA_3 + Flu 组合 (**C**) 以及 4 ºC 和黑暗中萌发 60 d。胚根伸出种皮 2 mm 作为种子完成萌发的标准。所有的数据为 50 粒种子四次重复的平均值±标准误。

Seeds were stratified at 10 °C and darkness for 120 d, and then germinated in different concentration of GA_3 (**A**), Flu (**B**) and GA_3 + Flu combinations (**C**) as well as at 4 ºC and darkness for 60 d. A radicle length of 2 mm was used as the criterion for completion of germination. All values are means ± SE of four replicates of 50 seeds each.

图 6 植物激素赤霉素 (GA_3) 和氟啶酮 (Flu) 对淫羊藿种子萌发的影响

Fig. 6 Effect of phytohormone gibberellin (GA_3) and fluridon (Flu) on germination of *Epimedium sagittatum* seeds

3 讨论

3.1 箭叶淫羊藿种子对水分的吸收

种子萌发随着水分吸收开始，当胚根突破种皮萌发结束 (Bewley et al., 2013)。箭叶淫羊藿种子的水分吸收具有快速吸水 (阶段Ⅰ) 和缓慢吸水 (阶段Ⅱ) 的两个阶段，缺乏吸水的第Ⅲ阶段 (图 1：A)。在阶段Ⅰ，种子的含水量迅速增加到 52%，表明箭叶淫羊藿种子的种皮是透水的，不具有物理休眠。阶段Ⅰ的水分吸收是由衬质势 (matrix potential) 驱动的，因为干种子的水势非常低 (Obroucheva & Antipova, 1997)。阶段Ⅱ的缓慢吸水直到 72 h (甚至更长，未表明数据) 是水分吸收的滞后期。这些结果与巫山淫羊藿种子的水分吸收类似 (樊家乙等, 2010)。阶段Ⅲ的水分吸收是由种子萌发所引起的；在吸胀的 72 h 内，箭叶淫羊藿种子的萌发率为零，因而没有观察到水分吸收的第Ⅲ阶段。在 25 °C 下，玉米和水稻种子的水分吸收具有阶段Ⅰ的快速吸水，阶段Ⅱ的短暂缓慢吸水以及阶段Ⅲ的迅速吸水 (图 1：A)；因为玉米和水稻种子的萌发率随着吸水逐渐增加，分别在吸胀后的 34 h 和 42 h 达到 50%萌发率 (图 1：B)。

3.2 脱水对种子萌发的影响

成熟脱水是正常性种子 (orthodox seed) 发育的末端事件，在植物种子 (质) 资源保存中起关键作用 (宋松泉等, 2022)。箭叶淫羊藿种子的含水量从 9.7%下降至 4.6%，种子经 4 °C 层积 60 d 后的萌发率仍然为 56.3% (图 2)，表明种子具有耐脱水性。值得注意的是，种子萌发率低于 60%，不是由于种子被脱水伤害，而是在 4°C 层积 60 d 未能完全解除种子的休眠特性 (图 3–5)。该研究结果能为淫羊藿属植物种子的干燥及其种质资源的长期保存提供耐脱水的依据。

3.3 温度对种子萌发的影响

温度是影响种子萌发的最重要的环境因素之一，它决定种子萌发的能力和速率，并打破种子的初生和/或次生休眠 (Brándel 2004; Baskin and Baskin 2014)。箭叶淫羊藿种子分别在 4 °C、10 °C、15 °C、20 °C、25 °C 和黑暗条件下吸胀 30 d，其萌发率为零，表明种子具有休眠特性。然而，在

chinaXiv:202208.00181v1

chinaXiv:202208.00181v1

4 °C 和 10 °C 的条件下，种子分别在吸胀的 115 d 和 145 d 开始萌发；到吸胀的 240 d，种子的萌发率分别为 55%和 44%；在 15 °C、20 °C 和 25 °C 的条件下，到吸胀的 240 d 种子的萌发率分别为 2%、0 和 0 (图 3：A)；表明箭叶淫羊藿种子具有深休眠特性，温度显著影响种子的萌发，以及 4~10 °C 可能是箭叶淫羊藿种子萌发的适宜温度。苏贺等 (2016) 的研究结果表明，巫山淫羊藿种子只能在低温 (4 ºC) 中萌发，不能在变温 (10 ºC /20 ºC) 中萌发。

在 10 °C 层积 60 d 后再转移到 4 °C 中层积 30 d 的种子，它们在 4、10、15、20、25 °C 下的萌发率分别为 88%、85%、3%、2%和 0 (图 2：B)，也表明种子的适宜萌发温度为 4~10 °C (图 3：B)。

3.4 层积处理对胚生长和种子萌发的影响

Graeber 等 (2012) 提出，休眠是一种数量性状，其深度随着发育进程而变化。初生休眠是种子在成熟过程中形成的，在生理成熟时达到最高水平；在随后的干藏 (后熟) 或层积过程中，种子的休眠深度逐渐降低 (Finch-Savage & Leubner-Metzger 2006; Holdsworth et al., 2008)。箭叶淫羊藿种子脱落时，种子中胚的体积较小 (E/S 为 0.07)；随着种子在 4 ºC 和/或 10 ºC 中层积时间的增加，胚逐渐从球形胚发育到心形胚、鱼雷形胚和成熟胚 (E/S > 0.8) (图 4)；表明箭叶淫羊藿种子具有形态休眠，在 4 ºC 和/或 10 ºC 层积过程中，胚能够逐渐生长发育。田向荣等 (2015) 观察到类似的结果，他们发现箭叶淫羊藿种子的胚未分化，停留在球形胚阶段；在后熟过程中，胚的结构逐步发育，形成子叶胚。朝鲜淫羊藿 (王晶等, 2013) 和巫山淫羊藿 (樊家乙等, 2010) 种子也具有类似的特性，需要经过一定时间的层积才能促进胚的生长。这些结果与朝鲜淫羊藿在田间条件下胚的生长、萌发和出苗的物候一致。朝鲜淫羊藿种子的胚未发育，在田间条件下在 6 月至 9 月初胚很少生长，但从 9 月下旬至 11 月胚迅速生长，到 12 月初胚已完成生长，胚的长度比初始长度增加了 16 倍；种子在次年 3 月萌发，萌发率达 84.4% (Rhie & Lee, 2020)。

当种子在 4 °C 中层积 30 d 后转移到 10 °C 中层积时，胚的生长速率比一直在 4 °C 中层积生长更快 (图 4：C)；在 10 °C 中层积的种子，其 E/S 比值显著大于在 4 °C 中层积的种子 (图 4：C 和 D)；表明 10 °C 层积有利于胚的生长发育。此外，种子在 10 °C 中层积 30 d 或者 60 d 后再转移到 4 °C 中层积时，其 E/S 比值均显著大于一直在 10 °C 中层积种子的 E/S 比值 (图 4：D)，表明胚和/或胚乳中可能存在某些生长抑制物质，在 4 °C 中层积比在 10°C 中层积更有利于这些生长抑制物质的释放和胚的生长；但这些生长抑制物质是什么？它们怎样抑制胚的生长需要进一步的研究。图 4：E 也表明，变温层积有利于箭叶淫羊藿种胚的生长发育。Rhie 和 Lee (2020) 发现，当朝鲜淫羊藿种子在 20 °C 或者 15 °C 的恒温下培养时，胚几乎不生长。

在 10 °C 萌发条件下，箭叶淫羊藿种子的萌发速率和萌发率随着在 4 °C 中层积时间的延长而显著增加 (图 5：A)。同样，在 4 °C 萌发条件下，箭叶淫羊藿种子的萌发速率和萌发率也随着在 10 °C 中层积时间的延长而显著增加 (图 5：B)；但在 10 °C 中层积 30 d 或者 60 d 然后在 4 °C 中的种子萌发速率和萌发率远远高于在 4 °C 中层积 30 d 或者 60 d 然后在 10 °C 中萌发的种子 (图 5：A 和 B)。这些萌发结果与层积温度对 E/S 比值的影响类似 (图 4)。付长征等 (2012) 报道，拟巫山淫羊藿种子在 15 ºC 中处理 1~7 个月后转移到 4 ºC 中，胚的生长和种子萌发率显著增加，但随着 15 ºC 处理时间的延长，种子的萌发率增加，而种子的萌发速率下降。

4 °C 层积 30 d + 10 °C 层积 90 d 或者 4 °C 层积 60 d + 10 °C 层积 60 d 的变温层积都能显著增加种子在 4 °C 中的萌发速率和萌发率，这也与变温层积对 E/S 比值的影响类似 (图 4：E)。

3.5 赤霉素和氟啶酮对种子萌发的促进作用

ABA是休眠诱导与维持的正调控因子，是种子萌发的负调控因子；GA能释放休眠，促进萌发和拮抗ABA的效应，以及它们的水平和信号转导在种子休眠释放和萌发中起重要作用 (Hauvermale et al. 2012; 宋松泉等, 2020a, b; Iwasaki et al., 2022)。对于在10°C和黑暗中层积120 d 的 (胚成熟) 箭叶淫羊藿种子，1和10 μmol • L^{-1} GA_3对种子的萌发没有作用，100 μmol • L^{-1}~10 mmol L^{-1} GA_3明显

地促进种子萌发，但种子的萌发率仍然低于70% (图6：A)；表明GA_3能部分促进种子的萌发。5~500 μmol • L^{-1}氟啶酮显著促进种子的萌发，其萌发率均大于90% (图6：B)；以及对于种子的萌发，10或者100 μmol • L^{-1}的氟啶酮对GA_3有加成作用 (图6：C)。苏贺等 (2016) 利用变温 (10 ºC/20 ºC) 层积90 d 的巫山淫羊藿种子为材料，研究了氟啶酮和赤霉素对巫山淫羊藿种子休眠解除的影响，发现氟啶酮的作用较强，赤霉素的作用较弱；氟啶酮可促进在变温中不能萌发的种子萌发。Rhie和Lee (2020) 也观察到，GA_3处理能增加朝鲜淫羊藿种子胚的生长，但对种子萌发的促进作用较小，萌发率低于10%。这些结果都表明ABA在抑制箭叶淫羊藿种子萌发中可能起重要作用。

4 结论

箭叶淫羊藿种子的种皮是透水的，不具有物理休眠；种子具有耐脱水性，能在低含水量和低温的条件下贮藏；在 4~25 ºC 和黑暗条件下，种子的萌发率为零；E/S 比值非常小，4、10 ºC 和变温层积能显著促进胚的发育以及增加种子的萌发速率和萌发率；GA_3 和氟啶酮显著增加种子的萌发速率和萌发率。根据 Baskin 和 Baskin (2004, 2014)，Finch-Savage 和 Leubner-Metzger (2006) 的观点，我们认为，箭叶淫羊藿种子的休眠类型为 MPD，释放休眠和促进萌发的最适方法是将种子在 10 ºC 中层积 30 d，然后在 4 ºC 中萌发。

参考文献

BASKIN JM, BASKIN CC, 2004. A classification system for seed dormancy [J]. Seed Sci Res, 14(1): 1–16.

BASKIN CC, BASKIN JM, 2014. Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination [M]. 2nd ed. San Diego: Academic Press.

BEWLEY JD, BRADFORD KJ, HILHORST HWM, et al., 2013. Seeds: physiology of development, germination and dormancy [M]. 3rd ed. New York: Springer.

BLACK M, BEWLEY JD, HALMER P, 2006. The encyclopedia of seeds. sciences, technology and uses [M]. Oxfordshire: CAB International: 203–213.

BRÁNDEL M, 2004. The role of temperature in the regulation of dormancy and germination of two related summer-annual mudflat species [J]. Aquat Bot, 79(1): 15–32.

CHEN F, MARTIN RC, SONG SQ, et al., 2010. Seed development and germination [M] // TRIGIANO RN, GRAY DJ. Plant tissue culture: development and biotechnology. Boca Raton, FL: CRC Press: 127–140.

DONG TT, TONG JH, XIAO LT, et al., 2012. Nitrate, abscisic acid and gibberellin interactions on the thermoinhibition of lettuce seed germination [J]. Plant Growth Regul, 66(2): 191–202.

DONOHUE K, DE CASAS RR, BURGHARDT L, et al., 2010. Germination, post-germination adaptation, and species ecological ranges [J]. Ann Rev Ecol Evol Syst, 41(1): 293–319.

FAN JY, GUO QS, LIU ZY, et al., 2010. Dormancy characteristics and breaking method of seeds from *Epimedium wushanense* [J]. Chin J Chin Mat Med, 35(24): 3242–3245. [樊家乙, 郭巧生, 刘作易, 等, 2010. 巫山淫羊藿种子休眠特性及破眠方法研究 [J]. 中国中药杂志, 35(24): 3242–3245.]

FINCH-SAVAGE WE, LEUBNER-METZGER G, 2006. Seed dormancy and the control of germination [J]. New Phytol, 171(3): 501–523.

FINKELSTEIN R, REEVES W, ARIIZUMI T, et al., 2008. Molecular aspects of seed dormancy [J]. Annu Rev Plant Biol, 59(1): 387–415.

chinaXiv:202208.00181v1

FU CZ, WANG XC, YANG XB, et al., 2012. Preliminary study on seed dormancy characteristics of *Epimedium pseudowushanense* [J]. Chin Agric Sci Bull, 28(18): 76–80. [付长珍, 王新村, 杨相波, 等, 2012. 拟巫山淫羊藿种子休眠特性的初步研究 [J]. 中国农学通报, 28(18): 76–80.]

GAO F, AYELE BT, 2014. Functional genomics of seed dormancy in wheat: Advances and prospects [J]. Front Plant Sci, 5: 1–11.

GRAEBER K, NAKABAYASHI K, MIATTON E, et al., 2012. Molecular mechanisms of seed dormancy [J]. Plant Cell Environ, 35(10): 1769–1786.

HAUVERMALE AL, ARIIZUMI T, STEBER CM, 2012. Gibberellin signaling: A theme and variations on DELLA repression [J]. Plant Physiol, 160(1): 83–92.

HOLDSWORTH MJ, BENTSINK L, SOPPE WJJ, 2008. Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination [J]. New Phytol, 179(1): 33–54.

HUANG X, SCHMITT J, DORN L, et al., 2010. The earliest stages of adaptation in an experimental plant population: strong selection on QTLs for seed dormancy [J]. Mol Ecol, 19(7): 1335–1351.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION, 1999. International Rules for Seed Testing [J]. Seed Sci and Technol, 27: 47−50.

IWASAKI M, PENFIELD S, LOPEZ-MOLINA L, 2022. Parental and environmental control of seed dormancy in *Arabidopsis thaliana* [J]. Ann Rev Plant Biol, 73: 355-378. doi.org/10.1146/annurev-arplant-102820-090750.

KANG SH, JEONG SJ, KIM SH, et al., 2012. Icariside II induces apoptosis in U937 acute myeloid leukemia cells: role of inactivation of STAT3-related signaling [J]. PLoS ONE, 7(4): e28706.

LI CC, ZHAO P, QIN YQ, et al., 2020. Research progress on pharmacological activity of Yinyanghuo (*Epimedium*) [J]. Acta Chin Med, 35(4): 781–786. [李聪聪, 赵鹏, 秦燕勤, 等, 2020. 淫羊藿苷的药理活性研究进展 [J]. 中医学报, 35(4): 781–786.]

National Pharmacopoeia Committee, 2020. Pharmacopoeia of the People's Republic of China [M]. 2020 ed. Vol. I, Beijing: China Medical Science and Technology Press: 340–342. [国家药典委员会, 2020. 中华人民共和国药典 [M]. 2020 版. 一部. 北京: 中国医药科技出版社: 340–342.]

OBROUCHEVA NV, ANTIPOVA OV, 1997. Physiology of the initiation of seed germination [J]. Russian J Plant Physiol, 44: 250–264.

RHIE YH, LEE SY, 2020. Seed dormancy and germination of *Epimedium koreanum* Nakai [J]. Sci Hortic, 272: 109600. doi:10.1016/j.scienta.2020.109600.

SONG SQ, LIU J, HUANG H, et al., 2020a. Gibberellin metabolism and signaling and its molecular mechanism in regulating seed germination and dormancy [J]. Sci Sin Vitae, 50(6): 599–615. [宋松泉, 刘军, 黄荟, 等, 2020a. 赤霉素代谢与信号转导及其调控种子萌发与休眠的分子机制 [J]. 中国科学, 50(6): 599–615.]

SONG SQ, LIU J, TANG CF, et al., 2022. Research progress on the molecular mechanism of seed desiccation tolerance [J]. Sci Agric Sin, 55(6): 1047–1063. [宋松泉, 刘军, 唐翠芳, 等, 2022. 种子脱水耐性的分子机制研究进展 [J]. 中国农业科学, 55(6): 1047–1063.]

SONG SQ, LIU J, XU HH, et al., 2020b. ABA metabolism and signaling and their molecular mechanism regulating seed dormancy and germination [J]. Sci Agric Sin, 53(5): 857–873. [宋松泉, 刘军, 徐恒恒, 等, 2020b. 脱落酸代谢与信号传递及其调控种子休眠与萌发的分子机制 [J]. 中国农业科学, 53(5): 857–873.]

SU H, WANG Y, YANG Y, et al., 2016. Effects of fluridone, gibberellin acid and germination temperature on dormancy-breaking for *Epimedium wushanense* [J]. Chin J Chin Mat Med, 41(14):

chinaXiv:202208.00181v1

ChinaXiv合作期刊

2625–2632. [苏贺, 王月, 杨阳, 等, 2016. 氟啶酮、赤霉素和发芽温度对巫山淫羊藿种子休眠解除的影响 [J]. 中国中药杂志, 41(14): 2625–2632.]

TIAN XR, ZHANG MY, LONG H, et al., 2015. Morphological and anatomy studies on after-ripening seeds of *Epimedium Sagittatum* Maxim [J]. Seed, 34(3): 36–38. [田向荣, 张明月, 龙华, 等, 2015. 箭叶淫羊藿 (*Epimedium sagittatum* Maxim) 种子后熟作用的形态解剖研究 [J]. 种子, 34(3): 36–38.]

WANG J, LIU PP, HE LH, et al., 2013. Factors influencing seed germimation of *Epimedium koreanum* Nakai [J]. J Shenyang Pharm Univ, 30(10): 807–811. [王晶, 刘蓬蓬, 何立华, 等, 2013. 朝鲜淫羊藿种子萌发的影响因子 [J]. 沈阳药科大学学报, 30(10): 807–811.]

WEITBRECHT K, MÜLLER K, LEUBNER-METZGER G, 2011. First off the mark: Early seed germination [J]. J Exp Bot, 62(10): 3289–3309.

chinaXiv:202208.00181v1